

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-63613

⑬ Int.Cl.⁴

A 61 K 31/505

識別記号

AAB
AAK
AAN
AED

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)3月22日

// C 07 D 475/00

7430-4C 審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 神経病治療剤

⑯ 特 願 昭61-206434

⑰ 出 願 昭61(1986)9月2日

⑱ 発 明 者	ハンスクリストフ・クルティウス	スイス連邦、ツエーハー8700 キュスナハト、ヨハニスブルク シュトラツセ 20
⑱ 発 明 者	アーロイス・ニーダービーゼ	スイス連邦、ツエーハー8122 プファフハウゼン、プファフェンビス 11
⑱ 発 明 者	ヴォルフガング・フライダラー	ドイツ連邦共和国、デー 7750 コンスタンツ市、リングウアー シュトラツセ 47
⑲ 出 願 人	鐘淵化学工業株式会社	大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号
⑳ 代 理 人	弁理士 朝日奈 宗太	外1名

明 細 書

1 発明の名称

神経病治療剤

2 特許請求の範囲

- 1 6-ヒドロキシメチル-テトラヒドロプロピリンを有効成分として含有してなる、テトラヒドロプロピリン欠乏に起因する神経病の治療剤。
- 2 該神経病がパーキンソン病である特許請求の範囲第1項記載の治療剤。
- 3 該神経病がフェニルケトン尿症である特許請求の範囲第1項記載の治療剤。
- 4 該神経病が内因性うつ病である特許請求の範囲第1項記載の治療剤。
- 5 該神経病が小児自閉症である特許請求の範囲第1項記載の治療剤。

3 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、6-ヒドロキシメチル-テトラヒドロプロピリンを有効成分として含有してなる、テトラヒドロプロピリン(以下、BH₄という)欠乏に起因する神経病の治療剤に関する。

〔従来の技術および発明が解決しようとする問題点〕

本明細書でいうBH₄欠乏に起因する神経病の例としては、具体的にはパーキンソン病、フェニルケトン尿症、内因性うつ病、小児自閉症があげられる。パーキンソン病は運動障害を主症状とする老年に多発する神経病であるが、その原因は脳の黒質-線条体系のドーパミン作動性神経細胞の変性減少に伴う脳線条体のドーパミン欠乏症であるといわれている。ドーパミンの欠乏は、その前駆体であるL-ドパを生合成するためのチロシン水酸化酵素の活性の低下、およびその補酵素であるテトラヒドロプロピリンの減少に起因すると考えられている。またフェニルケトン尿症は、肝臓および脳内神経細胞中

でBH₄の生合成ができず強度の欠乏状態になることに由来している。さらに代謝異常性小児自閉症にもBH₄の治療効果が期待されている。

パーキンソン病患者の治療には上記の知見をもとにL-ドーパの投与が過去10数年にわたって行なわれてきたが、最近ではBH₄の投与で治療効果のあることが知られている(特開昭59-

25323号公報)。さらに同様なチロシン水酸化酵素の補酵素活性を有するプテリン誘導体の開発が進められており、たとえば1',2'-ジアセチルーテトラヒドロピオプテリン、6-メチル-5,6,7,8-テトラヒドロプテリンまたはL-セビアプテリンなどに治療効果のあることが知られている(同公報)。これらのピオプテリン補酵素関連化合物には天然の補酵素であるBH₄と同程度の効果は期待できる。しかしながら、これを凌駕する効果を期待できる化合物は知られていなかった。

フェルケトン尿症については肝臓中でのフェニルアラニン水酸化酵素が作用する程度のBH₄

を投与する低投与治療と、多量に投与して脳中に移行させ神経細胞中の欠乏状態を回復する大量投与法が行なわれてきた。しかしながら、BH₄が血液脳関門を通過しにくいいため十分な効果をあげるに到っていない。

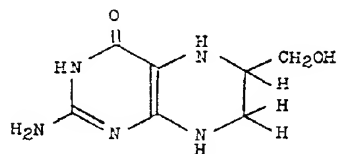
このようにBH₄欠乏に起因する神経病の治療のためフェニルアラニン水酸化酵素、チロシン水酸化酵素あるいはトリプトファン水酸化酵素の補酵素活性を有し、血液脳関門を通過しやすい治療剤の出現が持たれていた。

〔発明の目的〕

本発明の目的は、BH₄が血液脳関門を通過し難いことによって脳内BH₄欠乏に起因する神経病を治療する際に脳内での濃度を高めるためBH₄を大量に投与する必要があったという問題点を解決し、血液脳関門を通過しやすく、少量の投与で効果のある治療剤を提供することにある。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明の式：



であらわされる6-ヒドロキシメチルーテトラヒドロプテリン(以下、6HMPH₄という)は、同じくBH₄を補酵素とするトリプトファン水酸化酵素の補酵素活性を示すことが知られている(カトーら;ピオシミカ エ ピオフィジカ アクタ(Biochimica et Biophysica Acta)、611、241~250(1980)、246頁)。

本発明者らは、6HMPH₄がBH₄と同様にチロシン水酸化酵素およびフェニルアラニン水酸化酵素の補酵素活性を有し、しかも血液脳関門を通過しやすい点でBH₄よりはるかにすぐれていることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、6HMPH₄を有効成分として含有してなる、パーキンソン病やフェルケトン尿症などのBH₄欠乏に起因する神経病の治

療剤に関する。

〔作用および実施例〕

本発明の治療剤の有効成分である6HMPH₄は6位の炭素原子に関して立体異性体が存在するが、本発明の治療剤において有効なのは(6R)体である。しかしながら、(6R)体が含まれておれば(6S)体が共存してもよい。

本発明の治療剤の投与方法としては経口投与でも注射でもよい。注射によるばあい、静脈注射、筋肉注射などの従来の注射方法であってよい。また経口投与のばあいは錠剤、丸剤、カプセル剤、粉剤、液剤、懸濁剤などの慣用的な剤形で投与されてよい。本発明の治療剤は、医薬組成物として有効成分のほかに慣用される医薬用担体または賦形剤を含み、さらに他の併用しうる医薬も含むことができる。

経口剤は、たとえば6HMPH₄をアスコルビン酸/6HMPH₄=1/1~10/1の比率でアスコルビン酸とよく配合し、所定量を粉末状でカプセル化するか、または打錠して錠剤化することによ

って調製することができる。また注射剤は、たとえば 6HMPH₄ 粉末の所定量を殺菌処理済のリンゲル水中に溶解することによって調製することができる。

本発明の治療剤の有効投与量は、投与時期や症状などに応じて適宜定めることができるが、通常 0.1 ~ 500mg/kg 体重/日、好ましくは 1 ~ 100mg/kg 体重/日である。

なお、本発明の治療剤の有効成分である 6HMPH₄ は、たとえばマックス・ビスコンチーニら〔ヘルベチカ シミカ アクタ (Helvetica Chimica Acta)、56, 1710~1715 (1973)〕の方法により合成することができる。
(1) 6HMPH₄ のフェニルアラニン -4-ヒドロキシラーゼの補酵素活性の測定

フェニルアラニン -4-ヒドロキシラーゼは、ラット肝臓より、アール・シマン(R. SHIMAN)ら〔ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(J.B.C.)254 巻、11300~11308 頁(1979)、255 巻、4793~4800頁(1980)〕の

%のトリクロロ酢酸 50μl を加えて反応を終了させた。トリチウム置換水は、つぎの 3 層よりなるイオン交換カラムから溶出することにより他の反応系構成物から分離させた。カラムは、頂部より底部に向かって

レワチット(Levatis) SP[®] 1080
(60 ~ 150メッシュ、H⁺ 型、20× 5mm)
活性炭 1× 5 mm
レワチット(Levatis) MP[®] 5080
(60 ~ 160メッシュ、アセテート型、5× 5 mm)

なる 3 層より構成されていた。トリチウム置換水は、液体シンチレーションカウンターで定量した。

6HMPH₄ と BH₄ について第 1 図に示すようにラインウィーバー・パークプロットして V_{max} と K_m 値を求めた。結果を第 1 表に示す。

方法にしたがって精製した酵素を使用した。

つぎの反応液(全量 40μl) :

フェニルアラニン -4-
ヒドロキシラーゼ 6.7 ユニット
ジヒドロプロテリンリダクターゼ 7.8 ユニット
カタラーゼ 500 ユニット
KH₂ PO₄ 緩衝液 (pH 6.8) 5.6 μM
NADH (還元型ニコチン酸アミ
ドアデニンジヌクレオチド) 0.5 M
4-トリチウム-フェニルアラニン 7.8 mM
(約 700000 dpm)

補酵素活性検体 0.1 ~ 1.0 mM
を 37℃ で 45 分間インキュベートしたのち、PH 5.5 の酢酸ナトリウム溶液 50μl を加えて反応を終了させた。反応容器を氷水浴中で 0℃ に冷却し、N-ヨードサクシニミドを 50mg/ml の濃度で含むジメチルスルホキシド 25μl を加え、新しく生成したチロシンの芳香環の 3 および 5 位をヨード化した。これによりトリチウムは ³HOH として遊離した。5 分後、30

第 1 表

	K _m (M)	V _{max} (M)
6HMPH ₄	1.56 × 10 ⁻⁶	96 × 10 ⁻⁶
BH ₄	0.35 × 10 ⁻⁶	78 × 10 ⁻⁶

第 1 表において V_{max} は、反応時間 45 分中に反応液 40μl 中に生成したチロシンの濃度をあらわす。

(2) 6HMPH₄ のチロシン -3-ヒドロキシラーゼの補酵素活性の測定

酵素源としてラットの線条体を使用した。凍結した線条体組織を、0.1% トリトン X-100[®] を含む 0.05M KH₂ PO₄ 緩衝液 (pH 6.84) の 5 倍量中でホモジナイズした。ホモジネートを 4℃ において 40,000× g で 15 分

間遠心分離にかけ、上清液を集めた。酵素活性測定はつぎの組成からなる反応液 100 μ l を、7 ml のシンチレーションバイアル中において 37 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートした。

3,5-ジトリチウムチロシン 100M
(約 600,000dpm)
硫酸第 1 鉄アンモニウム 10 μ M
カタラーゼ 7500 ユニット
アスコルビン酸 1.0 mM
KH₂PO₄ 緩衝液 (pH 6.64) 50 mM
補酵素* 活性検体酵素 1.0~10 mM
* BH₄、6HMPH₄ いずれも (6R,S) 体を使用した。

3.0M 炭酸ソーダ (pH 11.69) 50 μ l を加えて反応を終了させ、さらにトルエン 5 ml を加えて 10 秒間はげしく渦巻かせた。15 分間静置して有機溶媒層を分離し、バイアルのトリチウム含量をシンチレーションカウンターで測定した。

6HMPH₄ と BH₄ について第 1 図に示すように

0.1N HCl を用い、線状体は 200 μ l 中において、小脳は 1200 μ l 中において、海馬は 400 μ l 中においてホモジナイズした。ホモジネートはドライアイス中で凍結保存した。必要に応じて解凍し、39000 \times g で 20 分間遠心分離し、上清を HPLC で分析した。なおホモジネートの収率は内部標準としてネオブテリンを加えて補正した。

HPLC: S5 ODS - カラム

溶出液 H₂O 2 l 中に
Na₂HPO₄ · 2H₂O 2.35g
クエン酸 5.6g
オクタンスルホン酸 650mg
EDTA 45mg
ジチオエリスリトール 50mg
2-プロパノール 140ml

を含む

溶出速度 1 ml / 分

6HMPH₄ および BH₄ の脳内組織への移行性を比較した結果を第 3 表に示す。

ラインウィーバー・パークプロットをして V_{max} および K_m 値を求めた。結果を第 2 表に示す。

第 2 表

	K _m (M)	V _{max} (M)
6HMPH ₄	7.7 \times 10 ⁻³	29 \times 10 ⁻⁶
BH ₄	10 \times 10 ⁻³	65 \times 10 ⁻⁶

第 2 表において V_{max} は、反応時間 15 分中に反応液 100 μ l 中に生成したドーバの濃度をあらわす。

(3) ラットの脳への 6HMPH₄ の移行試験

ラットの腹腔に 6HMPH₄ および BH₄ をそれぞれ 50mg/kg 体重注射し、2 時間後にラットを屠殺した。脳の線条体、海馬、小脳をとり出し、それらの組織における 6HMPH₄ および BH₄ の含有量をつぎの方法によりしらべた。

100ml 中にジチオエリスリトール 5 mg を含む

第 3 表

	6HMPH ₄ (pmole/mg 組織)	BH ₄ (pmole/mg 組織)
線条体	1.51	0.50
海馬	3.08	0.48
小脳	3.58	0.54

第 3 表から、いずれの組織に対する移行性も 6HMPH₄ が BH₄ に比べてすぐれていることがわかる。とくに 6HMPH₄ は BH₄ に比べて線条体では 3 倍、海馬および小脳では 6~7 倍の濃度に達していることがわかる。

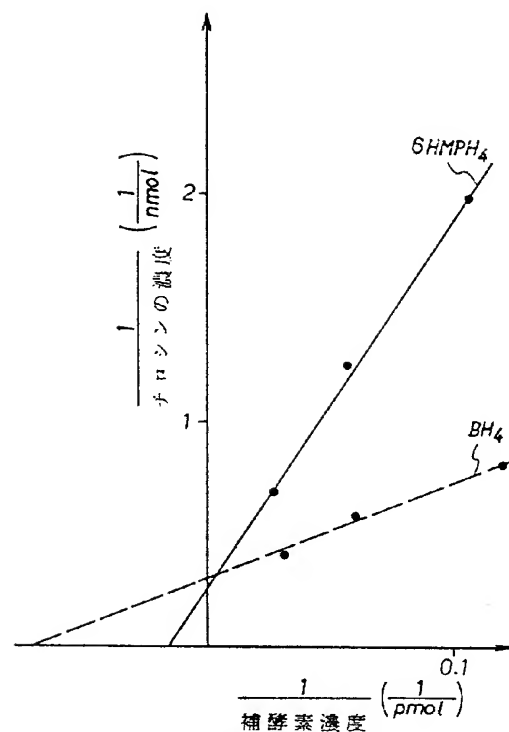
〔発明の効果〕

本発明の治療剤は、その有効成分である 6HMPH₄ が血液脳関門を通過しやすいため BH₄ のように大量に投与する必要がなく、パーキンソン病、フェニルケトン尿症などの脳内 BH₄ 欠乏に起因する神経病の治療に有効に用いることができる。

4 図面の簡単な説明

第1図および第2図は、(1) 6HMPH₄ のフェニルアラニン -4-ヒドロキシラーゼの補酵素活性の測定、および(2) 6HMPH₄ のチロシン -3-ヒドロキシラーゼの補酵素活性の測定における、6HMPH₄ とBH₄ についてのラインウィーバー・バークプロットをそれぞれあらわす。

才1 図



特許出願人
代理人弁理士

鐘淵化学工業株式会社

朝日奈奈太 ほか1名

朝日奈奈太
朝日奈奈太
朝日奈奈太

才2 図

